



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015016960-4 A2

(22) Data do Depósito: 15/07/2015

(43) Data da Publicação: 24/01/2017



(54) **Título:** PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS E USO DO MESMO

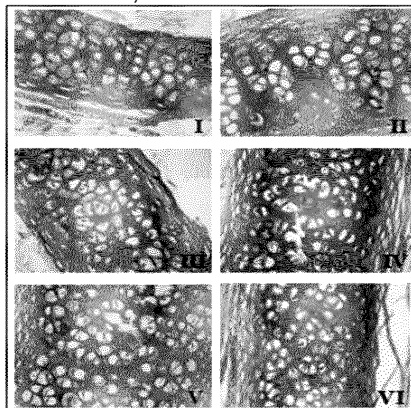
(51) **Int. Cl.:** A61L 27/36; A61F 2/04

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) **Inventor(es):** THAIANE CRISTINE EVARISTO; APARECIDA VITÓRIA GONÇALVES DE SOUZA; WONER MION; NATÁLIA MAYUMI INADA; VANDERLEI SALVADOR BAGNATO; PAULO FRANCISCO GUERREIRO CARDOSO; DANIELE CRISTINA CATANEO; ELENICE DEFFUNE

(74) **Procurador(es):** FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS E USO DO MESMO. A presente invenção refere-se a um processo de descelularização de órgãos, preferencialmente, traqueias por meio de LED, banhos ultrassônicos e agentes químicos. Esta tecnologia envolve métodos físicos e químicos como o congelamento/descongelamento e 5 a 20 ciclos de banho ultrassônico na frequência de 20 a 60 Khz durante 10 a 60 minutos seguido de irradiação com Light Emitting Diode (LED) de 475 a 830 nm \pm 20 nm, com exposição a 90 joules durante 30 a 90 minutos com posterior banho com detergente deóxicolato de sódio 1 a 6% durante 24 a 72 horas em agitação contínua e após os ciclos, o material é extensivamente lavado em tampão PBS e criopreservado para uso em futuros transplantes com células autólogas. O maior benefício encontrado está no elevado grau de descelularização, permitindo o implante in vivo, com menor grau de rejeição imuno-mediada, sem o uso de imunossupressor.



PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS E USO DO MESMOCAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo de aplicação da Química, Farmácia, Biotecnologia, e, mais especificamente, nas áreas de engenharia genética e necessidades humanas uma vez que se refere a um processo de descelularização de órgãos, preferencialmente traqueias, por meio de LED, banhos ultrassônicos e agentes químicos e uso do mesmo para produção de arcabouços biológicos para sediarem células autólogas na proposta de transplantes de órgãos com a preservação da arquitetura do órgão original. Uso potencial em traqueias, artérias, veias, coração, fígado, pulmão e pele.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Atualmente, tem-se usado suportes biológicos derivados de tecido e órgãos descelularizados em estudos pré-clínicos com animais e em aplicações clínicas em humanos. A utilização desses materiais naturais apresentam vantagens biológicas; porém, é necessário que se faça um preparo rigoroso que garanta a descelularização para evitar a reação imunológica no hospedeiro. Antígenos celulares xenogênicos e alogênicos são reconhecidos como estruturas estranhas ao hospedeiro e assim induzem uma resposta inflamatória ou uma rejeição imuno-mediada do tecido.

[003] O objetivo de qualquer protocolo de descelularização é remover todo o material celular e nuclear, preservando a composição, atividade biológica e integridade mecânica da matriz extracelular restante. Além disso, as substâncias utilizadas neste processo precisam ainda ter mínimo efeito residual, para não inibir o

crescimento celular após implantação da matriz no organismo.

[004] Apesar do avanço nas técnicas cirúrgicas, ainda não há um substituto traqueal adequado e a substituição traqueal permanece o maior desafio científico e técnico. Diante deste cenário e da realidade de que os tratamentos das anomalias traqueais englobam altos custos econômicos, sociais, e humanos, provocando um impacto negativo na vida dos indivíduos acometidos, o maior desafio da presente invenção é construir, por meio de técnicas de Engenharia de Tecidos, uma via respiratória funcional que seja uniforme e permita adesão celular nas superfícies externa e interna da matriz tubular tridimensional, cocultivando diferentes tipos celulares; e que seja altamente eficiente na manutenção da luz traqueal durante os movimentos respiratórios.

ESTADO DA TÉCNICA

[005] O documento US2014271904 descreve um processo para preparação de tecido biológico, humano ou animal, para implante por meio de descelularização. No entanto, diferentemente da presente invenção, são utilizadas substâncias químicas como dimetilsulfóxido e álcool, as quais não entram no processo de descelularização.

[006] O documento EP1315796 descreve um processo de engenharia tecidual por descelularização. Tal documento não entra em conflito com a presente invenção, pois descreve métodos mecânicos pulsáteis para estimular o crescimento do tecido descelularizado.

[007] O documento US2013028981 descreve também um processo de obtenção de tecido humano descelularizado, por meio de uma solução de lise não especificada. O detergente utilizado na presente invenção é considerado um agente surfactante, como proposto neste documento, mas as etapas do método em si são diferente.

[008] Os documentos "Botucatu usa células-tronco para criar traqueia de laboratório", "Modelo experimental de neotrquéia em coelho utilizando técnicas de engenharia de tecidos" e "Trachea of stem cells is a promise for cancer and respiratory diseases" descrevem tratamento com LED em traqueias para uso em transplantes. No entanto, os três documentos apenas mencionam o uso de LED, sem fornecer nenhuma informação detalhada do processo.

[009] As tecnologias de transplantes, em especial para traqueias, são baseadas na descelularização enzimática, que envolve procedimentos de elevado custo. Tais procedimentos não são realizados no Brasil. Nenhum documento da literatura existente foi identificado usando concomitantemente banho ultrassônico, LED e agentes químicos.

[010] Macchiarini e colaboradores realizaram o primeiro transplante de traqueia construída exclusivamente por técnicas de engenharia celular em 2008. Após este primeiro ensaio clínico, nove outros pacientes já foram submetidos à cirurgia utilizando procedimento parecido. O uso de traqueias descelularizadas e posteriormente rescelularizadas apresenta algumas limitações, como por exemplo: necessidade de diferentes tamanhos de traqueias, específicos para cada paciente; necessidade de doadores de

órgãos; contaminação bacteriana durante a manipulação *in vitro*; longo período para o processo de descelularização e risco de alteração das propriedades mecânicas e estruturais da matriz extracelular.

[011] Além disso, o protocolo de descelularização de traqueia de doador, com posterior rescelularização com as células do próprio paciente custa em torno de 40.000 - 60.000 euros. Sendo assim, a tecnologia proposta pela presente invenção tem como objetivo substituir as enzimas utilizadas na literatura por um agente de descelularização permanente, o que resulta em redução dos custos no preparo de um arcabouço para transplante.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[012] A presente invenção refere-se a um processo de descelularização de órgãos, preferencialmente, traqueias por meio de LED, banhos ultrassônicos e agentes químicos. Esta tecnologia envolve métodos físicos e químicos como o congelamento/descongelamento e 5 a 20 ciclos de banho ultrassônico na frequência de 20 a 60 Khz durante 10-60 minutos seguido de irradiação com *Light Emitting Diode* (LED) de 475 a 830 nm \pm 20 nm, com exposição a 90 joules durante 30 a 90 minutos com posterior banho com detergente deoxicolato de sódio 1 a 6% durante 24 a 72 horas em agitação contínua e após os ciclos, o material é extensivamente lavado em tampão PBS e criopreservado para uso em futuros transplantes com células autólogas. O maior benefício encontrado está no elevado grau de descelularização, permitindo o implante *in vivo*, com menor grau de rejeição imuno-mediada, sem o uso de imunossupressor.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[013] A Figura 1 mostra traqueias pré e pós descelularização; I e III - Traqueias pré-tratamento; II e IV - Traqueias pós-tratamento.

[014] A Figura 2 mostra a comparação das traqueias após os tratamentos de descelularização com diferentes detergentes; I - Traqueia tratada com Deoxicolato de Sódio 4% durante 48 horas; II - Traqueia tratada com SDS 2% durante 48 horas; III - Traqueia tratada com Triton X-100 2% durante 48 horas.

[015] A Figura 3 mostra traqueias pré e pós descelularização com SDS 0,1% por 15 horas; I - Traqueia pré-tratamento; II - Traqueia pós-tratamento.

[016] A Figura 4 mostra a histologia do segundo protocolo - I - Controle - 8 h; II - Controle - 24 h; III - SDS 1% com enzima - 8 h; IV - SDS 1% sem enzima - 8 h; V - SDS 1% com enzima - 24 h; VI - SDS 1% sem enzima - 24 h; VII- SDS 2% com enzima - 8 h; VIII - SDS 2% sem enzima - 8 h.

[017] A Figura 5 mostra a histologia do segundo protocolo - I - SDS 2% com enzima - 24 h; II- SDS 2% sem enzima - 24 h; III - Triton X-100 2% com enzima - 8 h; IV - Triton X-100 2% sem enzima - 8 h; V - Triton X-100 2% com enzima - 24 h; VI - Triton X-100 2% sem enzima - 24 h.

[018] A Figura 6 mostra a histologia do terceiro protocolo - I - Controle - 24 h; II- Controle pressão mecânica - 8 h; III - Controle pressão mecânica - 24 h; IV - Pressão mecânica + Triton X-100 2% - 8 h; V - Pressão mecânica + Triton X-100 2% - 24 h; VI - Pressão mecânica + SDS 2% - 8 h; VII - Pressão mecânica + SDS 2% - 24 h.

[019] A Figura 7 mostra a histologia do terceiro protocolo - I - Controle LED 475 nm na dose de 15 J/cm^2 - 8 h; II- Controle LED 475 nm na dose de 15 J/cm^2 - 24 h; III - Controle LED 630 nm na dose de 15 J/cm^2 - 8 h; IV - Controle LED 630 nm na dose de 15 J/cm^2 - 24 h; V - LED 475 nm na dose de 15 J/cm^2 + Triton X-100 2% - 8 h; VI - LED 475 nm na dose de 15 J/cm^2 + Triton X-100 2% - 24 h.

[020] A Figura 8 mostra a histologia do terceiro protocolo - I - LED 630 nm na dose de 15 J/cm^2 + Triton X-100 2% - 8 h; II- LED 630 nm na dose de 15 J/cm^2 + Triton X-100 2% - 24 h; III - LED 475 nm na dose de 15 J/cm^2 + SDS 2% - 8 h; IV - LED 475 nm na dose de 15 J/cm^2 + SDS 2% - 24 h; V - LED 630 nm na dose de 15 J/cm^2 + SDS 2% - 8 h; VI - LED 630 nm na dose de 15 J/cm^2 + SDS 2% - 24 h.

[021] A Figura 9 mostra a histologia do terceiro protocolo - I - Controle pressão mecânica + LED 475 nm na dose de 15 J/cm^2 - 8 h; II- Controle pressão mecânica + LED 475 nm na dose de 15 J/cm^2 - 24 h; III - Controle pressão mecânica + LED 630 nm na dose de 15 J/cm^2 - 8 h; IV - Controle pressão mecânica + LED 630 nm na dose de 15 J/cm^2 - 24 h; V - Pressão mecânica + LED 475 nm na dose de 15 J/cm^2 + Triton X - 100 2% - 8 h; VI - Pressão mecânica + LED 475 nm na dose de 15 J/cm^2 + Triton X - 100 2% - 24 h.

[022] A Figura 10 mostra a histologia do terceiro protocolo - I - Pressão mecânica + LED 630 nm na dose de 15 J/cm^2 + Triton X - 100 2% - 8 h; II- Pressão mecânica + LED 630 nm na dose de 15 J/cm^2 + Triton X - 100 2% - 24 h; III - Pressão mecânica + LED 475 nm na dose de 15 J/cm^2 + SDS 2% - 8 h; IV - Pressão mecânica + LED 475 nm na dose de 15 J/cm^2 + SDS 2% - 24 h; V - Pressão mecânica + LED 630 nm na

dose de 15 J/cm^2 + SDS 2% - 8 h; VI - Pressão mecânica + LED 630 nm na dose de 15 J/cm^2 + SDS 2% - 24 h.

[023] A Figura 11 mostra a segunda etapa do quarto protocolo - I - Controle - 24 h; II- Controle - 48 h; III - Controle LED 475 nm na dose de 90 J/cm^2 - 24 h; IV - Controle LED 475 nm na dose de 90 J/cm^2 - 48 h; V - LED 475 nm na dose de 90 J/cm^2 + SDS 2% - 48 h; VI - LED 475 nm na dose de 90 J/cm^2 + Triton X - 100 2% - 48 h; VII - LED 475 nm na dose de 90 J/cm^2 + DS 4% - 24 h; VIII - LED 475 nm na dose de 90 J/cm^2 + DS 4% - 48 h.

[024] A Figura 12 mostra o protocolo de descelularização das traqueias a) Emissores da luz da *Biotable*; b) Fragmentos traqueais (1 cm) nos poços da placa acoplada na base da *Biotable* (setas); c) Irradiação do LED com comprimento de onda de $450 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ na dose de 90 J/cm^2 totalizando 60 minutos de exposição.

[025] A Figura 13 mostra o monitoramento das traqueias descelularizadas (pelo protocolo considerado ideal) por microscopia eletrônica de varredura antes de ser recelularizada.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[026] A presente invenção descreve um processo de descelularização de órgãos, preferencialmente, traqueias compreendendo as etapas de:

a) Congelamento/descongelamento do órgão doado entre 1-24 meses sem adição de nenhum crioprotetor;

b) Banho ultrassônico, frequência de 20-60 Khz durante intervalo de tempo de 5-30 minutos;

c) Irradiação do LED com comprimento de onda de $450 \text{ nm}-830 \pm 20 \text{ nm}$ na dose de 90 J/cm^2 totalizando 30-90

minutos de exposição;

d) Adição de deoxicolato de sódio a 1 a 6% sob agitação 180 rpm durante 24-72 horas;

e) Lavagens com PBS sob agitação, durante 10 minutos, em PBS acrescido de 10% de antibiótico-antimicótico.

[027] As etapas b) até e) são repetidas de 5 a 20 ciclos a fim de se produzir um arcabouço não imunogênico, preservando-se a composição, estrutura e as propriedades mecânicas da matriz extracelular.

[028] Os órgãos descelularizados produzidos conforme descrito acima são aplicados em transplantes de órgãos com a preservação da arquitetura do órgão original.

Exemplo de concretização da invenção

Avaliação histológica e funcional do enxerto de neotraqueia de coelho desenvolvido por bioengenharia

[029] Foram realizados vários protocolos de tratamento das traqueias, a fim de encontrar o que mais se aproxima do objetivo da descelularização, ou seja, a remoção completa dos antígenos HLA das matrizes doadoras para posterior colonização com as células epiteliais e CTMs condrogênicas do receptor. Assim, foram testados métodos físicos (congelamento, agitação, pressão direta, irradiação eletromagnética não ionizante), associados com métodos químicos (Triton X-100, SDS e DS) e enzimáticos (DNase e RNase). Feito isso, as traqueias foram conservadas em freezer -80 °C ou geladeira, na presença de álcool 70%.

[030] Independentemente da diversidade dos protocolos, após os tratamentos químicos, os segmentos traqueais ficaram opacos, com cor perolada, mais rígida ao toque e não friáveis (Figura 1).

[031] As traqueias tratadas com o detergente SDS na concentração de 2% apresentaram uma característica não identificada nas traqueias tratadas com Triton X-100 2% ou DS 4%. Sistemáticamente, as traqueias tratadas com SDS ficaram mais rígidas ao final dos tratamentos, enrijecimento este que determinou uma apresentação semicircular (formato de C). Este fato se deve à provável destruição da matriz extracelular. Na Figura 2 observa-se o aspecto das traqueias após tratamento por DS, SDS e Triton X - 100 respectivamente.

Primeiro protocolo

[032] Foi realizado com traqueia recém-coletada, ou seja, que não foi submetida ao processo de congelamento. Retirou-se um anel da traqueia para a análise histológica pré-tratamento, e o restante do fragmento traqueal foi submerso em solução contendo SDS 0,1%, a 37 °C, por um período de 15 horas, sob agitação de 180 rpm. O fragmento foi então lavado, sob agitação, com PBS acrescido de 10% de sulfato de gentamicina; sendo que foram realizadas 5 lavagens, com duração de 10 minutos cada. Retirou-se mais um anel para a análise histológica pós-tratamento, e a traqueia foi armazenada em álcool 70% a 4 °C. Os fragmentos histológicos foram preparados, cortados e corados com hematoxilina-eosina (HE).

[033] No tratamento com SDS 0,1%, a 37 °C, por um período de 15 horas, sob agitação, observa-se destruição parcial do tecido da traqueia, com sinais de calcificação; e ainda há presença de núcleos. Assim, o protocolo não foi validado (Figura 3).

[034] A traqueia é formada por cartilagem bastante

rígida e isso dificulta a descelularização. Por isso, foi necessário aumentar a concentração desse detergente nos protocolos seguintes.

Segundo protocolo

[035] Foram testados doze tratamentos diferentes, baseando-se no estado da técnica. As traqueias utilizadas também eram recém-coletadas, e elas foram divididas, porque cada protocolo foi realizado com um fragmento de traquéia de 3 a 4 anéis. As soluções base dos doze protocolos incluíram EDTA 0,02%, antibiótico-antimicótico 1% em 10 ml de PBS, e esses tratamentos foram aplicados a 37° C sob agitação de 180 rpm. As soluções enzimáticas possuíam 0,5 mg/mL DNase Tipo I, 50 mg/mL RNase. Após os tratamentos, as traqueias foram lavadas por 2 horas em PBS a 37 °C sob agitação de 180 rpm; depois foram preparadas para a análise histológica e coradas com HE. As amostras 1 e 2 (controles da reação) - os fragmentos traqueais foram submersos apenas nas soluções base, na ausência de detergentes e enzimas, mas ficaram sob agitação durante 8 e 24 horas, respectivamente.

[036] Este protocolo tem como objetivo identificar a contribuição dos diferentes detergentes em presença ou não de enzimas sob a ação do tempo. No controle de 8 horas, observa-se um aspecto histológico normal. No controle de 24 horas, o tecido conjuntivo frouxo mais externo apresenta-se mais friável e a cartilagem mantém-se íntegra, com lacunas e núcleos de condrócitos evidentes. É notável que, mesmo com aumento de 10 a 20 X a concentração do detergente SDS, associado ao uso de RNase e DNase, não houve diferença histológica. Ocorreu a ruptura interna da

cartilagem com sinais de calcificação, mas permanecem íntegros os núcleos. Nem mesmo com o uso dos tratamentos mais longos (24h) ocorreu eliminação completa de DNA.

[037] O SDS alcançou eficientemente uma lise completa das membranas nucleares e celulares, porém o tratamento das enzimas não degradou o DNA completamente. Possivelmente, o mesmo deve ter ocorrido ao associar Triton X - 100 2% às enzimas. O aumento na quantidade de nucleases poderia determinar melhores resultados. Assim, verificou-se que o uso das enzimas nas concentrações utilizadas não contribui nos protocolos de descelularização. A literatura especializada já aponta que elevadas quantidades de enzima devem ser utilizadas para se obter resultados satisfatórios. Levando em consideração custo-benefício, essa técnica não foi validada.

[038] Dessa maneira, nenhum dos diferentes protocolos testados apresentou eficiência, sob o ponto de vista histológico. Estes resultados podem ser visualizados nas Figuras 4 e 5.

Terceiro protocolo

[039] Foram testados vários protocolos diferentes, baseando-se nos resultados observados no segundo protocolo, ou seja, os mesmos detergentes foram utilizados (Triton X-100 e SDS). Neste experimento utilizou-se um aparelho de LED com potência de 25 mW e densidade de potência de 1 mW/cm² nos comprimentos de onda 475 nm ± 20 nm (luz azul) e 630 nm ± 20 nm (luz vermelha). Assim, as traqueias foram submetidas a uma única irradiação eletromagnética não ionizante, com LED em modo contínuo nos comprimentos de onda 475 nm ± 20 nm e 630 nm ± 20 nm com dose de 15 J/cm²

totalizando 10 minutos de exposição. Além disso, essas traqueias foram submetidas à pressão mecânica (PM).

[040] Nesse terceiro protocolo, não houve utilização das enzimas (DNase e RNase). As traqueias utilizadas foram descongeladas em banho-maria, depois foram lavadas com salina, sob agitação de 150 rpm, a 37 °C durante 10 minutos. Essa etapa de lavagem com salina foi repetida, e ainda, uma terceira lavagem foi realizada com HEPES. Dando continuidade, essas traqueias foram colocadas em placas de Petri estéreis para aplicação dos LEDs. Uma placa foi irradiada com LED no comprimento de onda 475 nm ± 20 nm e a outra com LED no comprimento de onda de 630 nm ± 20 nm, totalizando 10 minutos de exposição em cada uma. Depois as traqueias foram divididas em fragmentos de 3 a 4 anéis; e esses fragmentos foram colocados em seus respectivos tubos *Falcon* estéreis de 15 ml com as suas respectivas soluções de descelularização. A PM foi realizada a cada hora, e as soluções de tratamento foram trocadas. Assim, nos tratamentos que incluíram ação mecânica por 8 horas, essa pressão foi realizada 8 vezes; já nos tratamentos de 24 horas, a ação mecânica foi realizada nas primeiras 12 horas, totalizando 12 vezes.

[041] As soluções base dos protocolos incluíram EDTA 0,02%, antibiótico-antimicótico 1% em 10 ml de PBS, e esses tratamentos foram aplicados a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Após os tratamentos, as traqueias foram lavadas por 2 horas em PBS a 37 °C sob agitação de 180 rpm; depois foram preparadas para a análise histológica e coradas com HE.

[042] Para facilitar a visualização dos

resultados, as características histológicas deste terceiro protocolo foram divididas em cinco quadros. O objetivo deste protocolo foi determinar a contribuição da pressão mecânica, associada aos detergentes (SDS e Triton X-100) sob a ação do tempo. Observa-se que a pressão mecânica não trouxe nenhuma contribuição efetiva aos protocolos de descelularização, ou seja, a pressão mecânica não facilitou o desprendimento celular, apenas dissociou os tecidos de sustentação das traqueias. Este resultado já era esperado, pois a pressão mecânica só é eficiente nos tecidos e órgãos que não apresentam uma matriz extracelular organizada de forma tão densa (Figura 6).

[043] Com relação à irradiação com LED, foi possível observar que as traqueias irradiadas com LED no comprimento de onda de $630 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ na dose de 15 J/cm^2 apresentaram um aumento na dimensão da sua cartilagem, assumindo o oposto do objetivo dos protocolos de descelularização, isto é, ocorreu proliferação celular. A literatura mostra que a irradiação com LED $630 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ em doses inferiores a 10 J/cm^2 estimula a proliferação celular. Observa-se esse estímulo também na dose de 15 J/cm^2 .

[044] Já o tecido cartilaginoso submetido à irradiação com LED no comprimento de onda de $475 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ na dose de 15 J/cm^2 apresentou várias lacunas sem células, como esperado; já que o LED $475 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ em doses superiores a 10 J/cm^2 provoca dano celular. Porém, mesmo nessas lâminas ainda há células presentes; por isso a necessidade de se aumentar a intensidade da irradiação com LED no comprimento de onda de $475 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ e os tempos de

tratamentos com os detergentes.

[045] As Figuras 7 e 8 demonstram esses resultados. Ao associar pressão mecânica, irradiação com LED nos comprimentos de onda $475 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ e $630 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ na dose de 15 J/cm^2 , e tratamentos químicos, observa-se os mesmos resultados citados nos parágrafos anteriores, assim, pode-se reafirmar que a pressão mecânica não contribui de forma visível no desprendimento celular. Estes resultados podem ser visualizados nas Figuras 9 e 10.

Quarto protocolo

[046] Esse protocolo foi realizado associando-se única irradiação de LED no comprimento de onda $475 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ e os tratamentos com os detergentes: SDS, Triton X-100 e DS. Foram realizados quatro protocolos.

[047] As traqueias utilizadas foram descongeladas em banho-maria, depois foram lavadas com salina, sob agitação de 150 rpm, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos. Essa etapa de lavagem com salina foi repetida, e ainda, uma terceira lavagem foi realizada com HEPES. Dando continuidade, essas traqueias sofreram única irradiação de LED no comprimento de onda $475 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$. Depois as traqueias foram divididas em fragmentos de 3 a 4 anéis; e esses fragmentos foram colocados em seus respectivos tubos *Falcon* estéreis de 15 ml com as suas respectivas soluções de descelularização. As soluções base dos quatros protocolos incluíram EDTA 0,02%, antibiótico-antimicótico 1% em 10 ml de PBS, e esses tratamentos foram aplicados a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 180 rpm. Após os tratamentos, as traqueias foram lavadas por 2 horas em PBS a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 180 rpm; depois foram preparadas para a análise histológica e coradas com HE.

[048] Como demonstrado, a irradiação com o LED no comprimento de onda de $475 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ na dose de 15 J/cm^2 não foi suficiente para retirar os núcleos, então, foi preciso aumentar a intensidade da irradiação. As irradiações desse LED nas doses de 30 J/cm^2 , 60 J/cm^2 e 90 J/cm^2 foram testadas; e a irradiação mais intensa, a de 90 J/cm^2 foi também a mais eficiente.

[049] Assim, essas traqueias irradiadas com LED no comprimento de onda $475 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ na dose de 90 J/cm^2 foram submetidas aos tratamentos químicos (SDS, Triton X-100 e DS). Estes resultados poderão ser visualizados na Figura 11. Não houve diferença significativa, em relação à quantidade de núcleos remanescentes, nos três tratamentos comparados: LED 475 nm na dose de 90 J/cm^2 associado aos detergentes (SDS 2%, Triton X - 100 2% e DS 4%) durante 48 horas.

[050] Os protocolos de descelularização validados na primeira etapa, sob o ponto de vista histológico, foram:

1- Congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm + irradiação do LED com comprimento de onda de $475 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ na dose de 90 J/cm^2 totalizando 30 minutos de exposição + detergente DS 4% durante 48 horas.

2- Congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm + irradiação do LED com comprimento de onda de $475 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ na dose de 90 J/cm^2 totalizando 30 minutos de exposição + detergente SDS 2% durante 48 horas.

3- Congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm + irradiação do LED com comprimento de onda de $475 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ na dose de 90 J/cm^2 totalizando 30 minutos de exposição + detergente Triton X - 100 2% durante 48 horas.

[051] Após análises destes resultados, a técnica foi novamente inovada conforme protocolo abaixo:

[052] As traqueias foram divididas em fragmentos de aproximadamente 0,7-1,0 cm (aproximadamente 4-5 anéis cartilagosos) que foram submetidos aos tratamentos. Foram realizados 5 e 10 ciclos do protocolo de descelularização escolhido a fim de se verificar quantos ciclos são necessários para a produção de um arcabouço não imunogênico, preservando-se a composição, estrutura e as propriedades mecânicas da matriz extracelular. Sendo assim, esse protocolo utiliza os seguintes fatores de descelularização:

a) Congelamento/descongelamento entre 3-24 meses sem adição de nenhum crioprotetor;

b) Banho ultrassônico no aparelho, frequência de 40 Khz durante 10 minutos;

c) Irradiação do LED com comprimento de onda de 450 nm \pm 20 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 60 minutos de exposição (Figura 8);

d) Adição de deoxicolato de sódio a 4% sob agitação 180 rpm durante 48 horas;

e) Lavagens com PBS.

[053] As etapas "b" até "e" foram repetidas 5 e 10 vezes. Posteriormente, essas traqueias foram lavadas 10 vezes em PBS acrescido de 10% de antibiótico-antimicótico (Gibco® Invitrogen) sob agitação, durante 10 minutos. Alguns anéis traqueais foram separados para análise histológica, sendo os fragmentos fixados em formol, incluídos em parafina, cortados em um micrótomo e corados com hematoxilina-eosina (HE), *alcian blue* e *picrossírius*.

Feito isso, as traqueias descelularizadas foram conservadas em geladeira em álcool 70%.

[054] Nesta etapa, 54 diferentes protocolos publicados foram testados. Não houve a identificação de um protocolo de excelência, além da identificação de que os protocolos publicados mais recentemente na literatura especializada (a partir de 2010), fazem o uso de grandes quantidades de enzimas do tipo DNases e RNases. Diante dos resultados obtidos testando as técnicas publicadas, e do elevado custo com enzimas, para a remoção de DNA residual, optou-se pela inovação com a associação de diferentes técnicas: mecânica, química, física e biofotônica, no sentido de se obter bons arcabouços, em custo razoável, que permita o exercício da medicina translacional em países em desenvolvimento e principalmente diante de crises econômicas sem precedentes.

[055] As traqueias descelularizadas pelo protocolo considerado ideal foram monitoradas por microscopia eletrônica de varredura antes de ser rescelularizada. A Figura 13 registra estes dados.

[056] Foram selecionados 10 animais para o recebimento do transplante traqueal assim processado (descelularização ideal + rescelularização com células tronco autólogas). A Tabela 1 representa os dados obtidos:

Tabela 1: Dados dos animais pós-transplante da segunda etapa

Grupo	Peso (pré)	Peso (pós)	Infecção	Dificuldade resp.	Presença de rolha	T após transp.
IV - Sham (n=4)	3,6 KG	4,0 KG	Não	Não	Não	90 dias

V	-	3,4 KG	3,2 KG	Não	8 animais	8 animais	42-90 dias
Descelularizada							
(n=10)							
VI	-	3,5 KG	3,2 KG	Não	Sim	Sim	40-42 dias
Rescelularizada							
(n=10)							

[057] Como pode ser observado, sem a presença de protocolos imunomoduladores, as traqueias produzidas pelas técnicas de engenharia de tecidos em protocolo inovador de descelularização, foram viáveis por até 90 dias (dia do sacrifício). Levando em consideração a vida média do coelho e fazendo-se análise comparativa entre as espécies, isto poderia corresponder a uma sobrevivência maior que 5 anos em seres humanos.

Reivindicações

1. Processo de descelularização de órgãos **CARACTERIZADO** por compreender as etapas de:
 - a) Congelamento/descongelamento do órgão doado;
 - b) Banho ultrassônico;
 - c) Irradiação com LED;
 - d) Adição de deoxicolato de sódio;
 - e) Lavagens com PBS.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por a etapa a) compreender o congelamento entre 1-24 meses sem adição de nenhum crioprotetor.
3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por a etapa b) compreender banho ultrassônico na frequência de 20 a 60 Khz durante 10 a 60 minutos.
4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por a etapa c) compreender irradiação LED com comprimento de onda de 450 a 830 nm \pm 20 nm na dose de 90 J/cm² entre 30 a 90 minutos de exposição.
5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por a etapa d) compreender a adição de deoxicolato de sódio 1 a 6% sob agitação 180 rpm durante 24 a 72 horas.
6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por a etapa e) compreender lavagem sob agitação, durante 10 minutos, em PBS acrescido de 10% de antibiótico-antimicótico.
7. Processo, de acordo com qualquer umas das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** por as etapas b) até e) serem repetidas de 5 a 20 ciclos para produzir um arcabouço não imunogênico.

8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** por ser preferencialmente para descelularização de traqueias.

9. Órgãos descelularizados **CARACTERIZADOS** por serem produzidos conforme processo descrito nas reivindicações 1 a 8.

10. Uso de órgãos descelularizados, conforme descritos na reivindicação 9, **CARACTERIZADO** por ser para transplantes de órgãos com a preservação da arquitetura do órgão original.

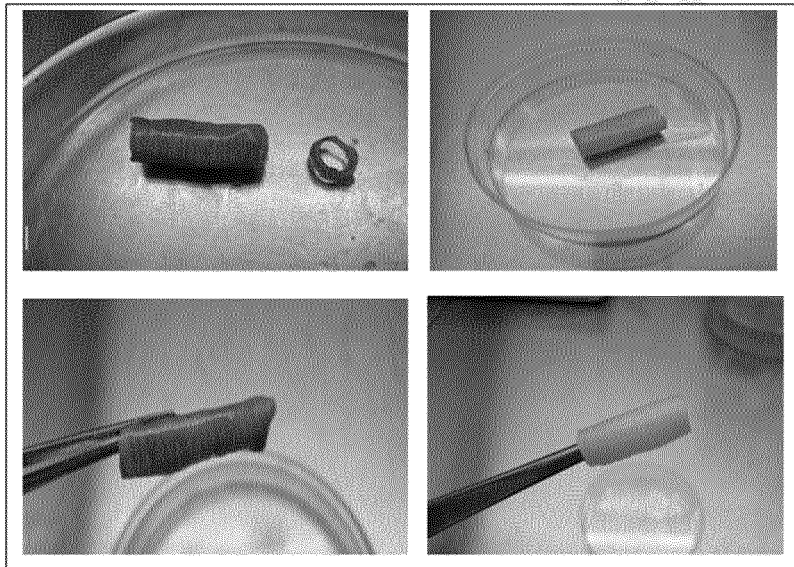


Figura 1

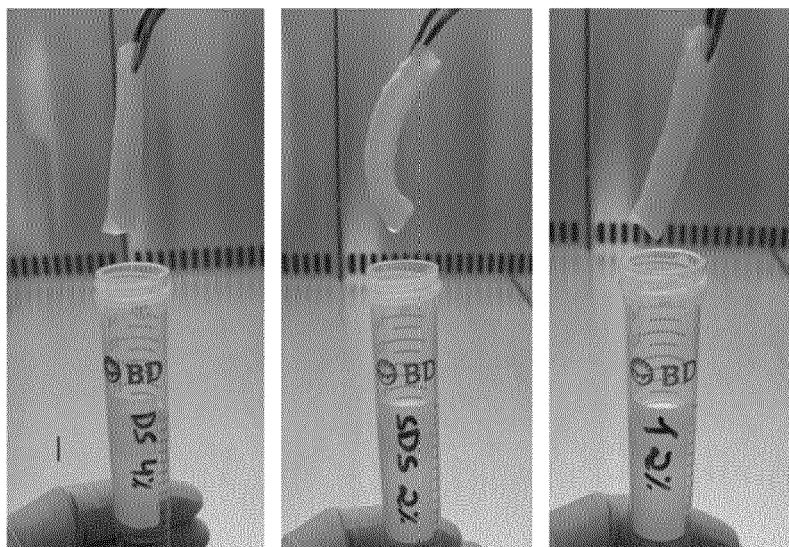


Figura 2

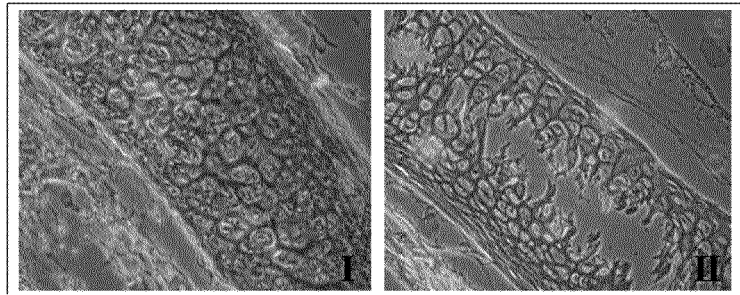


Figura 3

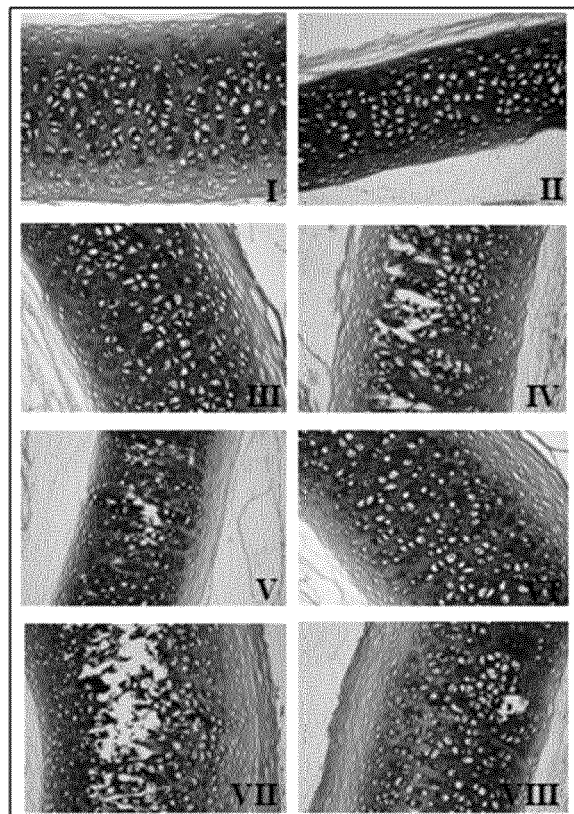


Figura 4

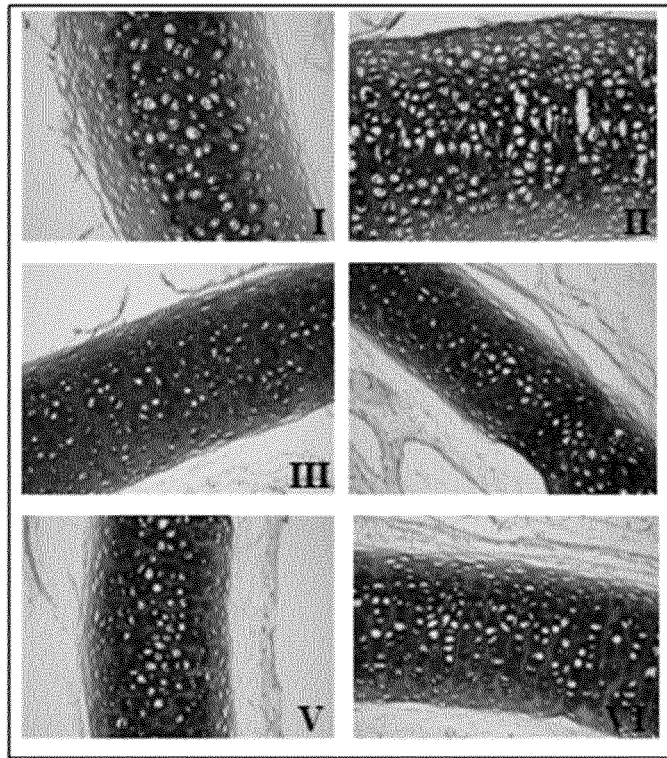


Figura 5

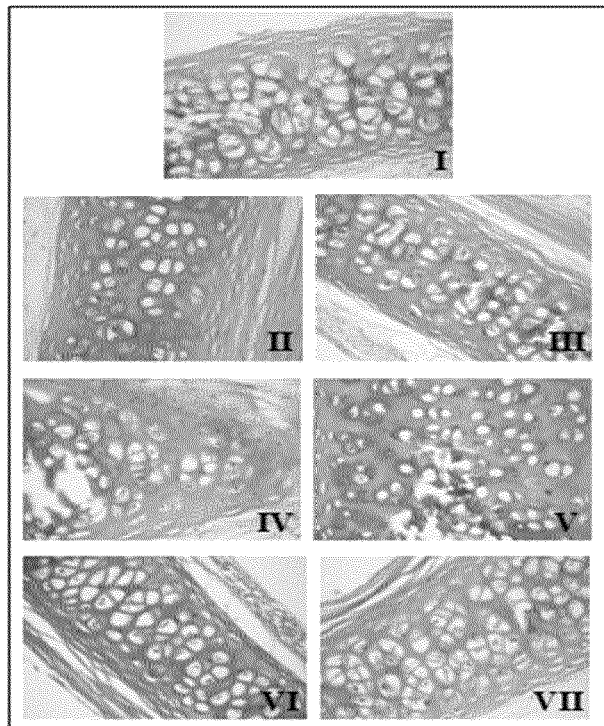


Figura 6

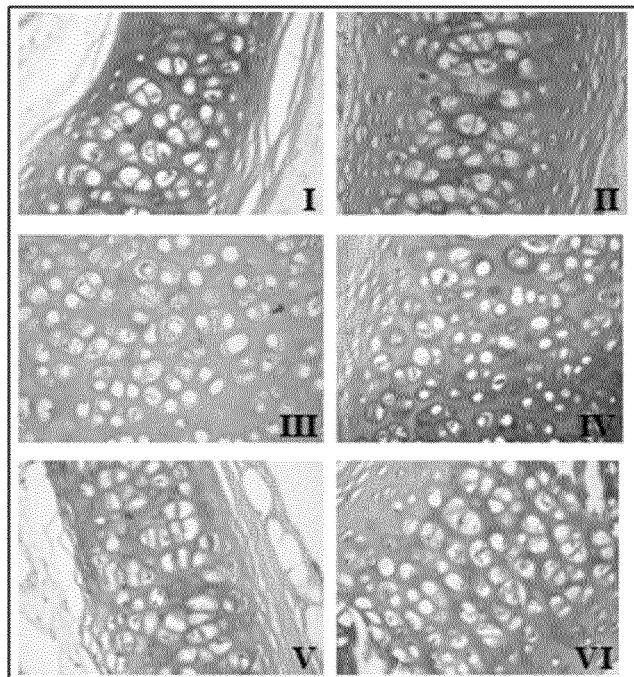


Figura 7

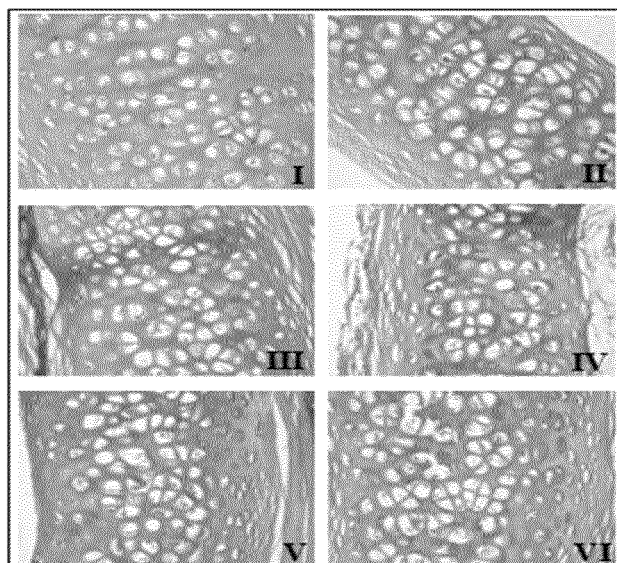


Figura 8

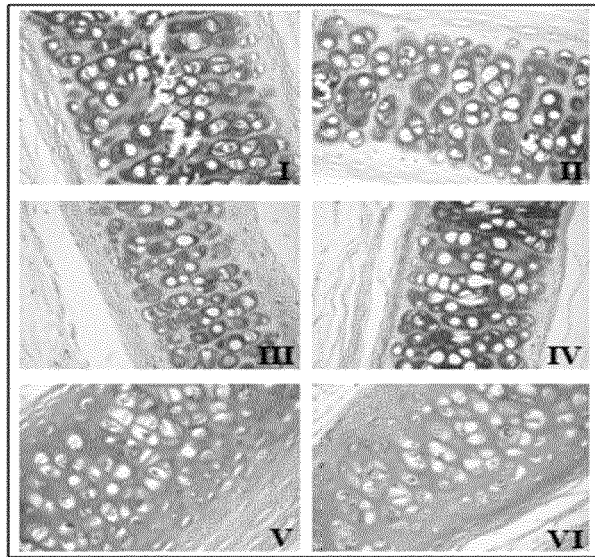


Figura 9

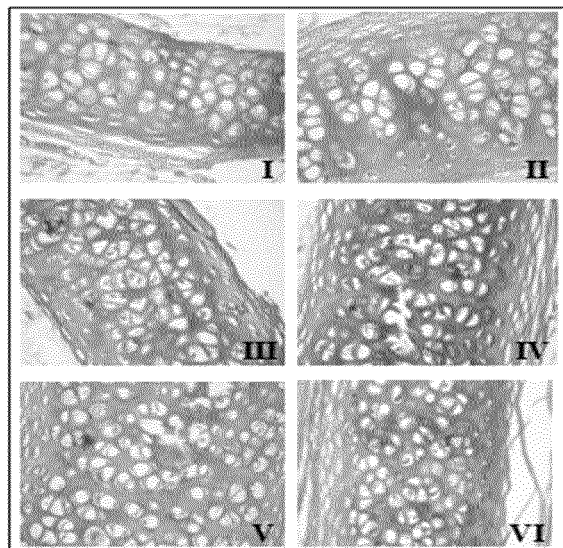


Figura 10

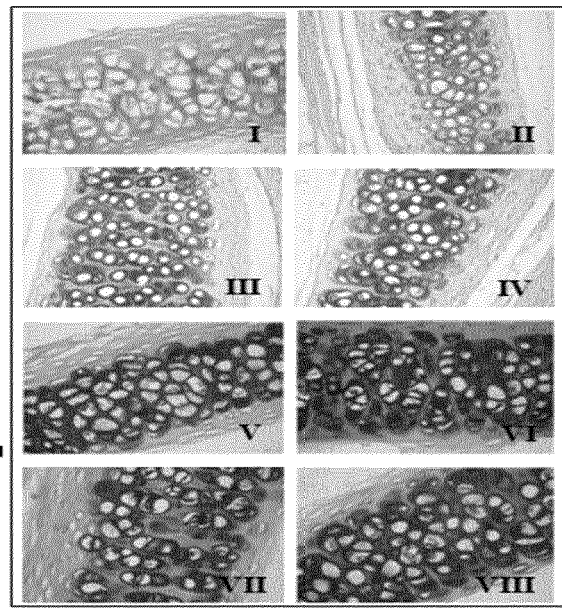
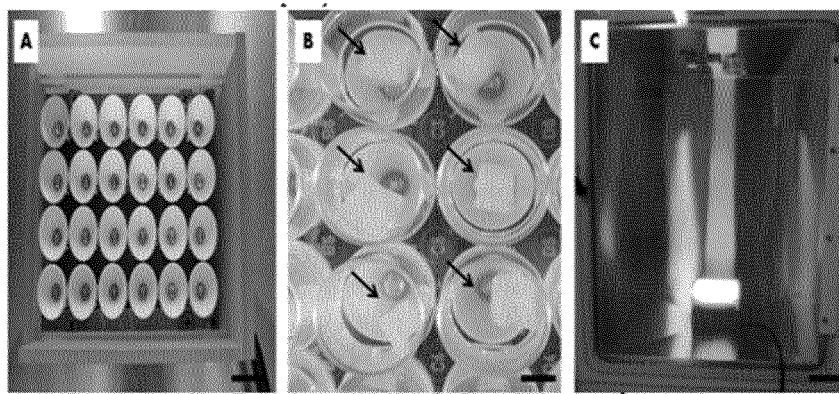


Figura 11



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 1 cm.

Figura 12

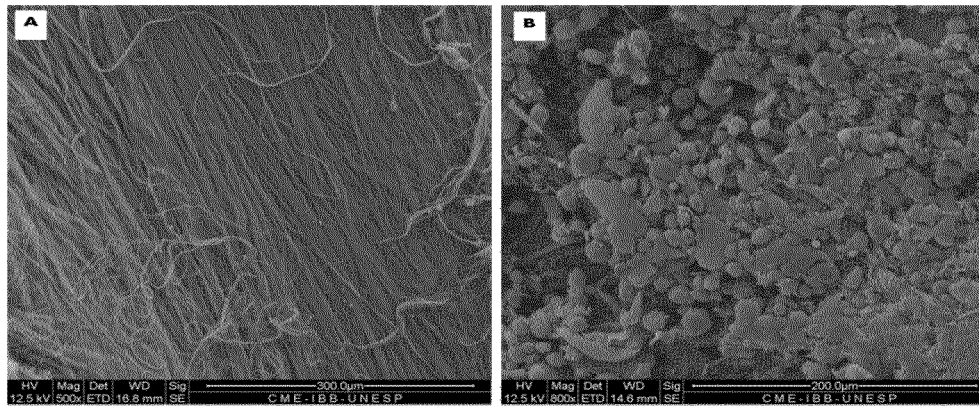


Figura 13

Resumo**PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS E USO DO MESMO**

A presente invenção refere-se a um processo de descelularização de órgãos, preferencialmente, traqueias por meio de LED, banhos ultrassônicos e agentes químicos. Esta tecnologia envolve métodos físicos e químicos como o congelamento/descongelamento e 5 a 20 ciclos de banho ultrassônico na frequência de 20 a 60 Khz durante 10 a 60 minutos seguido de irradiação com *Light Emitting Diode* (LED) de 475 a 830 nm \pm 20 nm, com exposição a 90 joules durante 30 a 90 minutos com posterior banho com detergente deóxicolato de sódio 1 a 6% durante 24 a 72 horas em agitação contínua e após os ciclos, o material é extensivamente lavado em tampão PBS e criopreservado para uso em futuros transplantes com células autólogas. O maior benefício encontrado está no elevado grau de descelularização, permitindo o implante *in vivo*, com menor grau de rejeição imuno-mediada, sem o uso de imunossupressor.